

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



542733

(43) 国際公開日  
2004年8月5日 (05.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/065609 A1

(51) 国際特許分類: C12P 7/62, C12N 15/54, 9/10

幌市 西区八軒3条西5丁目 2-26-46 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000500

(22) 国際出願日: 2004年1月21日 (21.01.2004)

(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE, Kunihisa); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-13762 2003年1月22日 (22.01.2003) JP  
特願2003-94881 2003年3月31日 (31.03.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K.K.) [JP/JP]; 〒105-8518 東京都港区芝大門一丁目13番9号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蒲池 元昭 (KAMACHI, Motoaki) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 蒲池 晴美 (KAMACHI, Harumi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 青木 裕史 (AOKI, Hirobumi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 恵良田 知樹 (ERATA, Tomoki) [JP/JP]; 〒001-0922 北海道札幌市北区新川2条13丁目4-3 Hokkaido (JP). 田島 健次 (TAJIMA, Kenji) [JP/JP]; 〒063-0843 北海道札幌市

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR ACYL-TRANSFER ENZYME REACTIONS WITH ACYL- COENZYME A

(54) 発明の名称: アシルコエンザイムAを用いるアシル基転移酵素反応方法

(57) Abstract: A process for acyl-transfer enzyme reactions which comprises transferring the acyl group of an acyl-coenzyme A (acyl-CoA) to an acyl acceptor, characterized in that an acyl-CoA is produced and/or reproduced in the reaction system from coenzyme A by chemical transthioesterification with an acyl thioester and used for the reaction. According to the process, an expensive acyl-CoA is nonenzymatically reproduced in the reaction system, so that an acyl-transfer enzyme reaction can be made to proceed continuously only by adding a small amount of an acyl-CoA and an acyl donor and an acyl acceptor to the system. Thus, the process is applicable to industrial production of various compounds including useful biomolecules and synthesis of polymers such as polyester.

(57) 要約: 本発明はアシルコエンザイムAのアシル基をアシル基受容体に転移するアシル基転移酵素反応方法において、アシルチオエステルとの化学的チオエステル交換反応によって、コエンザイムAよりアシルコエンザイムAを反応系内で生成および/または再生させて反応することを特徴とするアシル基転移酵素反応方法に関する。本発明によれば、高価なアシルCoAが反応系内で非酵素的に再生されるため、少量のアシルCoAとアシル基供与体及び受容体を系に投じるだけでアシル基転移酵素反応が連続的に進行する。従って、本発明の方法は、有用な生体分子を含む種々の化合物の工業的製造方法やポリエステル等の高分子の合成に適用できる。

WO 2004/065609 A1

## 明 細 書

## アシルコエンザイムAを用いるアシル基転移酵素反応方法

## 5 技術分野

本発明は、アシルコエンザイムA（以下、コエンザイムAをC○Aと表記することがある。）による種々の有機化合物へのアシル基転移酵素反応方法に関する。さらに詳しく言えば、本発明は、アシル基転移酵素を用いるアシル化合物の製造方法において、極めて高価なアシルC○Aを追加添加することなく反応を継続的に行い、その生産性を飛躍的に改善することによってアシル基転移酵素を種々の化合物の工業的製法に利用することを可能ならしめた新規なアシル基転移酵素反応方法に関する。

さらに、本発明は化学的チオエステル交換反応をアシルC○A再生系としたC○A酵素カップリング法に関する。

15 また、本発明はC○A酵素を用いて、スフィンゴ脂質のごとき重要な生理活性物質を製造する方法に関する。

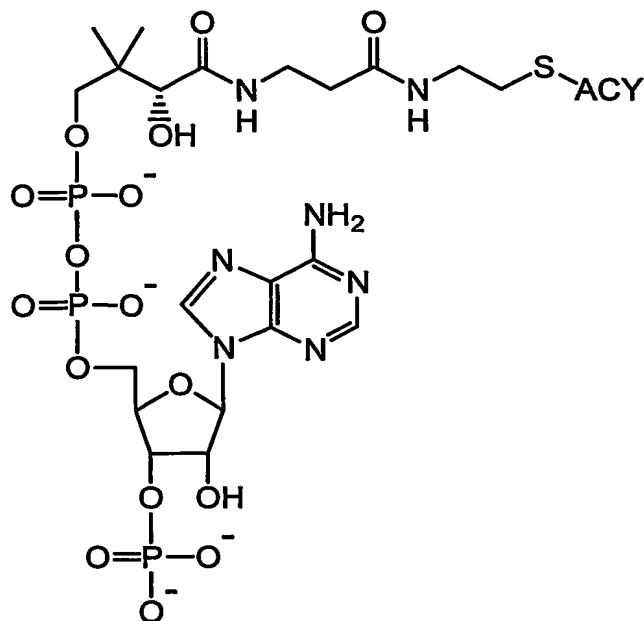
さらに、本発明は酵素反応による高分子化合物の製造方法に関する。さらに詳しく言えば、チオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させてアシルコエンザイム（アシルC○A）を反応系内で再生させてチオエステル

20 から高分子化合物を一貫して合成することの出来る効率的な生分解性の高分子化合物、特にポリエステル製造方法に関する。

## 背景技術

C○Aは全ての生物種でアシルキャリア／アシルアクティベーターとして機能する物質である。例えば、アセチルC○Aはクエン酸回路を経由する脂肪酸・グルコース等主要な生体代謝のキー物質である他、ある種のアシルC

CoA誘導体はコレステロールや脂肪酸生合成においても重要な役割を果たしている。CoAはこれらの代謝に関わる酵素触媒反応（CoA酵素）の補助因子（補酵素）として必須であり、代替不可能な物質であり、下記式で表わされる。



5

（式中、ACYはアシル基である。）

CoA酵素には、転移させるアシル基の構造および基質（アシル基を導入する化合物）により種々のCoA酵素が存在する。従来、各種のCoA酵素を用いて物質を製造しようとする試みは多く成されており、例えば、抗生物質や医薬、ポリケチド合成経路を利用する各種化学物質の製造、アミノ酸類、ポリヒドロキシ酸などの製造例がある。

10

これらの方法ではアシルCoAは反応においてアシル基受容体と等モル消費される。従って、必要なアシルCoAを廉価に生産する必要がある。

上記の方法では、いずれも、発酵的に生産される生体内のアシルCoAを用いるか、生産系とは別個に製造したアシルCoAを用いている。発酵的に生産される生体内のアシルCoAを用いる場合は、生体内で生産されるアセ

15

チルC o AやマロニルC o Aといった特定のアシルC o Aしか利用し得ない。この課題を解決すべく、アセチルC o Aと各種脂肪酸間で酵素的にエステル交換を行い、非生体的なアシルC o Aを生産する技術も報告されている。生産系とは別個に製造したアシルC o Aを用いる方法は、汎用性が有り一般的

5 5 に取られる方法であるが、このようにして製造したアシルC o Aは極めて高価であり、アシル基転移反応に使用するには等モル必要であることにかわりはない。

アシルC o Aの製造方法としては、アシルクロライドによる化学合成法、酸無水物を用いる化学合成法、クロロ炭酸エチルとの混合酸無水物を用いる

10 10 化学合成法、チオエステル交換による化学合成法 (Z. Naturforsch 29C, 469-474(1974) 、Z. Naturforsch 30c, 352-358 (1975)) 、J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2520、J. Biol. Chem., 1985, 260, 13181、その他多くの化学合成法が一般に用いられている。しかしながらこれらの化学的方法は一般にチオール基への選択性が低いものが多く、非選択的なアシル化反応により収量が低下する問題が

15 15 あった。これらの製法は現在も用いられるが、アシルC o Aの実験室的調製法として用いられているにとどまっていた。

化学合成法の弱点を克服すべく、酵素的アシルC o Aの製造法も精力的に研究されている。すなわち、アセチルC o A合成酵素を用いる方法や脂肪酸C o A合成酵素を用いる方法などが報告されている (Appl. Microbiol.

20 20 Biotechnol., 1994, 40, 699-709) が、これらの酵素反応法ではその触媒である酵素を必要量得ることが非常に困難である。

酵素を用いる製法に関しては、これらをアシルC o A再生系としてC o A酵素反応と協同させたカップリング法に関する研究も報告されている。すなわち、アシル基転移反応により消費されたアシルC o Aを酵素反応により再

25 25 生して再び反応に用いるものであり、ホスホトランスアセチラーゼを用いるカップリング法、カルニチンアセチルトランスフェラーゼを用いるカップリ

ング法、アセチルC o A合成酵素を用いるカップリング法、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素を用いるカップリング法などである。これらの方法はチオール基への選択性が高く、特にアセチルC o A合成酵素は基質特異性が広く各種のアシルC o Aを生成し得ることから有用である。

- 5      しかしながら、これらは酵素によりアシルC o Aを再生しており、このような酵素的再生系は反応速度が遅いこと、酵素が不安定であること、反応にATPや比較的高価な副成分を必要とすること、高濃度のC o Aでは反応できないことなど、それぞれに課題が残されて一般に対象物の価格が余程高価で無い限り、アシルC o Aを 10,000 回以上回転させなければコスト的に工業的
- 10   製法とは成り得ないと言われており、上記の方法は工業的製造法として充分とは言えないものであった。ジメチルアミノピリジンのN-アセチル体を用い非酵素反応を利用してアセチルC o Aを再生する試みもあるが (Bioorganic Chem., 1990, 18, 131-135) 、大量の有機溶媒を使用し2相系であるため生成物の精製上問題があり、工業的製法には適していない。
- 15   以上のように、現在までC o A酵素を工業的製法として利用することを可能とするに充分な、アシルC o A再生系は知られていなかった。

- スフィンゴ脂質は、スフィンゴシンのようなスフィンゴイド塩基に由来する脂質であり、動物、植物及び微生物の細胞膜に存在する。ヒトのスフィンゴ脂質の正確な機能はまだわかっていないが、この化合物群が、神経系の電
- 20   気シグナル伝達および細胞膜の安定化に関与している。スフィンゴ糖脂質は、免疫系において機能を有し、特に特定のスフィンゴ糖脂質は細菌毒の受容体として、またおそらくは細菌及びウイルスの受容体としても機能することが示されている。

- セラミドはスフィンゴシン、ジヒドロスフィンゴシンまたはフィトスフィンゴシ
- 25   ンを塩基として含む、スフィンゴ脂質の特定のグループである。セラミドは、皮膚の上側層である角質層の主要脂質成分であり、重要な障壁機能

を有している。セラミドのようなスフィンゴ脂質を含有する組成物の局所塗布は、例えば皮膚の障壁機能及び水分保持特性を改善することが知られている (Curatolo, Pharm. Res., 4:271-277(1987) ; Kerscher ら, Eur. J. Dermatol., 1:39-43(1991))。

- 5      スフィンゴイド塩基それ自体は、シグナル伝達経路において重要な酵素であるプロテインキナーゼCの活性を阻害することによって、いくつかの生理的作用を媒介することがわかっている。更に、スフィンゴイド塩基は、化粧品組成物またはそれらの抗炎症活性及び抗菌活性のための皮膚科用組成物に含まれる。
- 10      現在、化粧品用の異種スフィンゴ脂質調製物は、主に動物供給源から抽出されているが、産業的規模では比較的経費のかかる方法であるばかりでなく、例えばウシ海綿状脳症 (BSE) の潜在性のため動物組織以外の供給源から入手できる純粋かつ構造の特定されたスフィンゴ脂質の新規供給源に関心が増している。
- 15      酵母 Pichia ciferrii のような微生物は、スフィンゴ脂質、スフィンゴシン、フィトスフィンゴシン及び／またはそれらの誘導体を生成することが発見されている (Wickerham 及び Stodola, J. Bacteriol., 80:484-491(1960))。スフィンゴ脂質それ自身の供給源、及び他の商業的に価値のある化合物を生成するための出発材料の供給源を提供し、これらの化合物の動物性供給源の使用に対し実現
- 20      可能な代用を与える。しかし微生物による生産は、スフィンゴイド塩基の微生物細胞に対する毒性のために、生産性の改善が困難であり (Pinto ら, J. Bacteriol., 174:2565-2574(1992) ; Bibel ら, J. Invest. Dermatol., 93:269-273(1992))、より効率的な製造方法の提供が切望されていた。

- また、近年環境問題への意識の高まりから、従来主流を占めてきた合成高
- 25      分子から環境に優しい生分解性高分子への関心が高まっている。

その一つであるポリヒドロキシアルカノエート (以下、PHAと略記する

ことがある。)は、一般には微生物の発酵生産により製造され、生分解性が高いことから注目を集めているポリエステルであり、90種以上の種類のものが知られている(FEMS Microbiol. Lett., 1995, 128, 219-228)。その中でもポリ(3-ヒドロキシブチレート)(以下、PHBと略記することがある。)、  
5 ポリ(3-ヒドロキシバレレート)(以下、PHVと略記することがある。)、  
ポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシバレレート)(以下、PHB-co-PHVと略記することがある。)は、その製造のしやすさ、及びその特性が良好であったことから研究開発が進んだ(特開昭57-150393号公報(米国特許第4393167号)、特開昭59-220192号公報(欧州特許公開第  
10 0114086号)、特開昭63-226291号公報(欧州特許公開第0274151号)、特開昭63-269989号公報)。しかし微生物の発酵生産では微生物体内にPHAを蓄積するためにその生産性は低く、また微生物を粉碎してPHAを抽出し、精製するためにコストもかかるなど問題点も多かった。

その後、発酵生産のメカニズムの解析が進んだことから微生物体内へのP  
15 HAの蓄積濃度が飛躍的に向上し、また、微生物体内へのPHAの蓄積状態の解析が進んだことから微生物からの抽出、精製コストも下がる結果となり、PHAの微生物的製造の実用化が始まった。

また、PHAを生産する微生物も多種に渡ることが次第に明らかになってきたことから、PHB、PHV、PHB-co-PHV以外のPHAへの研  
20 究開発も急速に進み、物性を改良するためコポリマーの研究開発もされている(特開昭63-269989号公報、特開昭64-48821号公報、特開平1-156320号公報、特開平1-222788号公報、特開平5-93049号公報)。

しかし、微生物の発酵生産によるPHAの製造方法では複雑な生物代謝経路を経るために必ずしも所望のPHAを作り出せるわけではなく、またPH  
25 Aのバリエーションも限定される。また発酵生産の制御方法によっては所望のホモポリマーとならずにコポリマーになることもあり、また逆にコポリマ

一生産においても必ずしも所望の重合比の均質なコポリマーを生産できる訳ではない (FEMS Microbiol. Rev., 1992, 103, 207-214)。さらに精製工程においても多種の化合物を含む微生物菌体より所望の P H A を取り出すために、その純度の向上にも工業的生産においては限界がある。このように微生物発酵  
5 による P H A の製造は様々な問題を抱えている。

一方、近年急速に進んだ遺伝子組換え技術により、P H A を重合する酵素であるポリヒドロキシアлкаノエートシンターゼ (P H A S) の遺伝子が単離され、その発現を増強することにより P H A の生産の向上も図られるようになった (特開平 7-265065 号公報、特開平 10-108682 号公報、特表 2001-516574  
10 号公報 (WO99/14313) )。

さらに遺伝子組換え技術を使うことで P H A S の大量分離精製もできるようになり、微生物発酵を用いない P H B のインビトロ (in vitro) 重合方法が開発され、均質で高純度な P H B が生産できるようになった (Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92, 6279-6283、Int. Symp. Bacterial. Polyhydroxyalkanoates, 1996, 28-35、  
15 Eur. J. Biochem., 1994, 226, 71-80、Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, 49, 258-266、Macromolecules, 2000, 33, 229-231)。

その後、P H B 以外の P H A も同様のインビトロ (in vitro) 重合方法で合成できることが示され、微生物発酵法では達成できなかった P H A のバリエーションの制限が無くなり、P H A のバリエーションが格段に広がることが示  
20 唆された (Biomacromolecules, 2000, 1, 433-439、Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56, 131-136、Macromolecules, 2001, 34, 6889-6894)。この方法ではホモポリマー以外にコポリマーをも合成することが可能である。

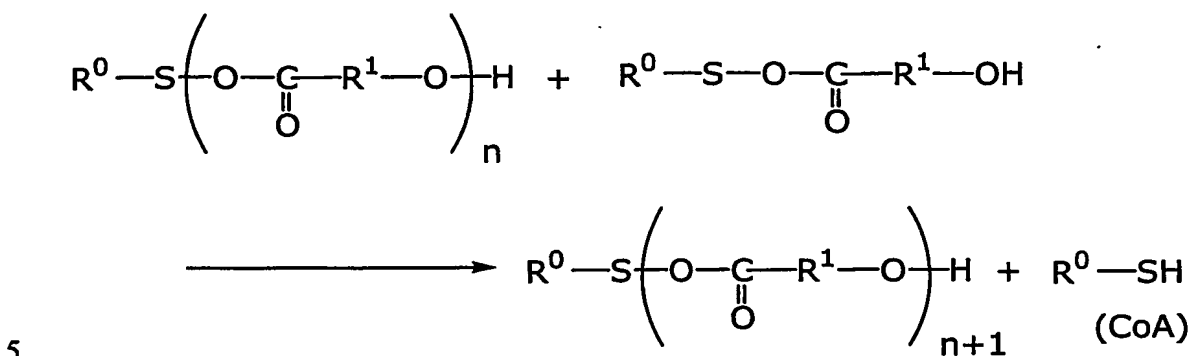
しかし、インビトロ (in vitro) 重合方法では反応出発物質にアシル C o A を使用しなければならないが、上述の通り、その合成には種々の問題がある。

25 そのためアシル C o A の使用量を極めて少量に抑えることや、工業的に容易に合成可能な他の化合物を出発物質として用いる高分子化合物の製造方法



の開発が望まれている。

一方、インビトロ (in vitro) 重合方法では、酵素の基質としてアシルC o Aを用い、酵素が反応してPHAが重合されると共に、反応系内には遊離したC o Aが放出される (下記式)。



(式中、 $\text{R}^0$ は $\text{R}^0-\text{SH}$ がC o Aを表わす有機基であり、 $\text{R}^1$ は任意のアルキレン、 $n$ は重合度に相当する整数である。)

このように、アシルC o Aからのアシル基転移反応が1回起こる度に繰り返し単位が1単位ずつ付加され、C o Aが1分子放出される。

- 10 インビトロ (in vitro) 重合方法ではこのC o Aは遊離状態のまま反応系内に留まり蓄積されるのみであり、高分子重合反応の収率は反応系内に投入したアシルC o Aの当量を超えることはない。このためPHAの生産性は極めて低く、インビトロ (in vitro) 重合方法で作製したPHAのコストは非常に高価にならざるを得ない。更に重合が進むにつれて反応系内のC o A濃度が高ま
- 15 ることで、酵素反応への阻害効果も懸念される。

- なお、この遊離して反応系内に高濃度で存在するC o Aの有効利用方法としてリサイクリングする試みもなされている(FEMS Microbiology Letters, 1998, 168, 319-324)。これは重合酵素反応液中に酢酸とアセチルC o AシンセターゼとATPを共存させることで重合反応後に遊離してくるC o Aをアセチル
- 20 C o Aに変換し、さらにプロピオニルC o Aトランスフェラーゼと3-ヒドロキシブチレートも共存させることで重合酵素の基質となる3-ヒドロキシ

ブチレートC o Aを得るものである。しかしこの方法では精製が困難な酵素を3種類も使用し、さらに極めて高価であるATPも必須であることから工業的な生産方法に適用することは極めて難しい。

- このようにインビトロ重合方法では、その反応基質にアシルC o Aを使わなければならず、アシルC o Aは非常に高価であることから、これを反応基質に用いたままPHAを工業的に生産するのではPHAの製造コストを下げるのが極めて困難であると言わざるを得ない。またC o AをアシルC o Aにリサイクリングするにも取得が困難な酵素が多種必要であり、かつ、ATPのような高価な化合物が必要である。さらにPHAの生物、特に微生物を用いた製造方法では、PHAのバリエーションは限定され、更に生物体内での代謝により共重合体が重合される可能性が非常に高く、所望のPHAのみを製造するのは難しいと言える。これらのことからPHAのバリエーションが多く、かつ、その生産において簡易に合成できる化合物を出発物質に用いて、PHAの製造コストが下がるような製造方法の開発が望まれていた。

15

#### 発明の開示

本発明は、アシルC o A再生系でC o A酵素を用いる工業的なアシル基転移酵素反応方法、特に生体物質等の生理活性物質の生産に有用なアシル基転移酵素反応方法を提供することを課題とする。

- 20 また、本発明の課題は、酵素反応で有用なスフィンゴイド塩基類を製造する全く新しい半合成製造方法を提供することにある。さらにはその製造の際に、触媒量の補酵素（C o A）で効率的に製造できる経済的な方法を提供することにある。

- さらに、本発明の課題は、酵素反応で有用な生分解性の高分子化合物を製造する際に、触媒量の補酵素（C o A）で効率的に製造できる方法を提供することにある。

本発明者らは、アシルC o Aの再生系について、効率、速度、コスト、選択性および酵素反応とのカップリング可否に関し鋭意研究した結果、これまで調製にのみ用いられていた化学合成法の一つであるチオエステル交換反応を酵素反応系とカップリングし得ることを突き止め、本発明を完成するに至った。

このチオエステル交換反応は中性～弱塩基性域の系で進行すること、アシル基の基質特異性が極めて広いことから、チオエステル交換反応が起こり得る領域で反応性を示すC o A酵素の何れともカップリングが可能である。

さらに、本発明者らは、このカップリング法をスフィンゴ脂質生合成経路におけるキー酵素であるセリン・C-パルミトイルトランスフェラーゼに適用し、チオフェニル脂肪酸とセリンから、C o Aを介した脂肪酸鎖の脱カルボキシ的転移反応により、重要な生理活性物質であるスフィンゴイド塩基類を生成する方法等を確立することに成功した。

さらに、本発明者らは高効率なPHAの製造方法を開発すべく、有機化合物からPHAに関連する種々の化合物について新たに合成経路を見出すべく鋭意検討を行った結果、インビトロ重合方法にチオエステル交換反応を組み合わせることで、反応出発物質を容易に合成可能なチオフェニルエステルに代替することが出来、さらに重合反応で必須であるアシルC o Aについてもその再生反応を同一反応液系内で行うことが可能であり、C o Aの濃度を抑えつつ、アシルC o A消費量を劇的に減少させることが出来ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下のアシル基転移酵素反応方法に関する。

1. アシルコエンザイムA（アシルC o A）のアシル基を転移するアシル基転移酵素反応において、チオール化合物のアシルエステルであるアシル基供与体との化学的チオエステル交換反応によって、コエンザイムAよりアシルコエンザイムAを反応系内で生成および／または再生させて反応させるこ

とを特徴とするアシル基転移酵素反応方法。

2. 反応系内にアシル基供与体、アシル基受容体、コエンザイムA、及びアシル基転移酵素を同時に含み、アシル基供与体のアシル基を化学的チオエステル交換反応によってコエンザイムAに転移させてアシルコエンザイムAとし、アシルコエンザイムAのアシル基をアシル基受容体に転移させる前項1に記載のアシル基転移酵素反応方法。
- 5 3. アシル基供与体のアシル基でアシルコエンザイムAを生成および／または再生しながら行う前項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
4. チオール化合物が芳香族チオールである前項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
- 10 5. 芳香族チオールが置換基を有していてもよいチオフェノールである前項4に記載のアシル基転移酵素反応方法。
6. アシル基受容体がアミノ酸および／またはその誘導体である前項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
- 15 7. アシル基受容体がセリンおよび／またはその誘導体である前項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
8. アシル基転移酵素がセリン C-パルミトイルトランスフェラーゼである前項1または2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
9. セリン C-パルミトイルトランスフェラーゼがスフィンゴモナス (Sphingomonas) 属細菌由来のものである前項8に記載のアシル基転移酵素反応方法。
- 20 10. アシル基転移酵素がスフィンゴシン N-アシルトランスフェラーゼである前項1または2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
11. 反応系内にアシル基供与体、アシル基受容体、コエンザイムA、及びアシル基転移酵素を同時に含み、アシル基供与体のアシル基を化学的チオエステル交換反応によってコエンザイムAに転移させてアシルコエンザイム
- 25

Aとし、アシルコエンザイムAのアシル基をアシル基受容体に転移させる反応において、アシル基転移酵素が高分子重合酵素であり、高分子化合物を合成する前項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。

12. アシルコエンザイムAまたはアシル基転移酵素反応による生成物を  
5 アシル基受容体としてアシル基転移酵素反応を繰り返すことにより高分子化合物を生成する前項11に記載のアシル基転移酵素反応方法。

13. アシルチオエステルが芳香族チオールのアシルエステルである前項  
11に記載のアシル基転移酵素反応方法。

14. 芳香族チオールのアシルエステルがヒドロキシアルカノエートチオ  
10 フェニルエステルである前項13に記載のアシル基転移酵素反応方法。

15. ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが3-ヒドロキシ  
アルカノエートチオフェニルエステルである前項14に記載のアシル基転移  
酵素反応方法。

16. 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが3-ヒドロ  
15 キンプチレートチオフェニルエステルである前項15に記載のアシル基転移  
酵素反応方法。

17. 高分子重合酵素がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼである  
前項11に記載のアシル基転移酵素反応方法。

18. ポリヒドロキシアルカノエートシンターゼがラルストニア (Ralstonia)  
20 属由来である前項17に記載のアシル基転移酵素反応方法。

19. ラルストニア (Ralstonia) 属がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia  
eutropha) である前項18に記載のアシル基転移酵素反応方法。

20. ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) がラルストニア・  
ユートロファ (Ralstonia eutropha) ATCC17699 である前項19に記載のアシル  
25 基転移酵素反応方法。

21. 前項7乃至9のいずれかに記載のアシル基転移酵素反応を用いるス

フィンゴイド塩基類の製造方法。

22. スフィンゴイド塩基類が3-ケトジヒドロスフィンゴシンである前項21に記載の製造方法。

23. 前項10に記載のアシル基転移酵素反応を用いるセラミド類の製造方法。

24. 前項11乃至20のいずれかに記載のアシル基転移酵素反応を用いる高分子化合物の製造方法であって、高分子化合物がポリエステル類であるポリエステル類の製造方法。

25. ポリエステル類がポリヒドロキシアルカノエートである前項24に記載のポリエステル類の製造方法。

26. ポリヒドロキシアルカノエートがポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)である前項25に記載のポリエステル類の製造方法。

27. ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)がポリ(3-ヒドロキシブチレート)である前項26に記載のポリエステル類の製造方法。

15

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明によるチオエステル交換によるアシルC o A再生系とのカップリング反応を示すスキームである。

#### 20 発明の詳細な説明

本発明によると、図1に示すように、アシル基供与体、アシル基受容体、C o A、及びアシル基転移酵素(C o A酵素)を一つの系に存在させ、反応進行により消費されるアシルC o Aが、酵素反応と同系内においてアシル基供与体とコエンザイムAとの化学的チオエステル交換反応により生成・再生されるカップリング反応によってアシル基転移反応を行うことができる。

本発明の一つの態様においては、反応進行により消費されるアシルC o A

を化学的チオエステル交換反応により生成・再生させる。この結果、高価なアシルC o Aを少量のみ反応系に存在させるだけで効率的なアシル基転移反応を実現できる。

- また、本発明の別の態様においては、アシルC o Aまたはアシル基転移反
- 5 応による生成物をさらにアシル基受容体とする。この結果、アシル基転移反応の繰り返しにより効率的な重合体生成反応を実現できる。

上記第2の態様（重合体生成反応）は上記第1の態様（高効率アシル基転移反応）の一部であるが、以下、便宜上、第1の態様（高効率アシル基転移反応）と第2の態様（重合体生成反応）に分けて説明する。

10 (1) 高効率アシル基転移反応

(1-1) C o A酵素

- この態様において使用するC o A酵素には、アシルC o Aを補足因子（補酵素）とするものである以外に特に制限は無い。これらの酵素の例としては、アセチルグルタミン酸シンターゼ（EC 2. 3. 1. 1）、アセトアセチルC o Aチオラーゼ（EC 2. 3. 1. 9）、セリン C-パルミトイル
- 15 トランスフェラーゼ（EC 2. 3. 1. 50）等、「EC 2. 3. 1. x」シリーズに属するトランスフェラーゼ類が挙げられる。これらの酵素類は既に多くの生物に存在することが明らかにされており、各種の生物から分離精製がなされている（Enzyme Nomenclature, 178-199, Academic Press, INC.(1992)）。中でも、中性～弱塩基性域に至適p Hを示す酵素がさらに好適
- 20 である。これらC o A酵素は精製酵素であってもよいが、C o A酵素活性を有する触媒菌体あるいはその処理物を用いることもできる。但し、この場合は、アシルC o Aを補欠因子とする目的以外の酵素の影響を、欠損変異株の使用、活性阻害、失活処理等により回避することが望ましい。

25 (1-2) アシル基供与体

本発明による高効率アシル基転移において使用するアシル基供与体は、C

○ A と非触媒的にチオエステル交換反応が起こり得るチオール化合物のアシル  
 エステル（本願において単に「アシルチオエステル」ともいう。）であれ  
 ば制限は無いが、芳香族チオールのアシルエステルが好ましい。芳香族チオ  
 ールの例としては、チオフェノール、メチルチオフェノール、クロロチオフ  
 5 エノール、2-メルカプトチアゾール、2-メルカプトイミダゾール、2-  
 メルカプトトリアゾール、2-メルカプトベンゾチアゾール、2-メルカプ  
 トベンゾイミダゾール、2-メルカプトピリジン等を挙げることができる。  
 特に好適な例として、チオフェノールのアシルエステル類（フェニル基が置  
 換基を有する場合も含め、本願において単に「チオフェニルエステル」とも  
 10 いう。）が挙げられる。

アシルエステルのチオールに対応するアシル基としては、基本的に制限無  
 く使用することができる。例えば、アセチル ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ )、プロピオニル  
 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$ )、ブチリル ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ )、イソブチリル  
 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCO}-$ )、アクリロイル ( $\text{CH}_2=\text{CHCO}-$ )、メタク  
 15 リロイル ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}-$ )、パルミトイル ( $\text{CH}_3-[\text{CH}_2]_{14}\text{CO}-$ )、ステアロイル  
 ( $\text{CH}_3-[\text{CH}_2]_{16}\text{CO}-$ )、オレオイル  
 ( $\text{CH}_3-[\text{CH}_2]_6\text{CH}=\text{CH}-[\text{CH}_2]_6\text{CO}-$ ) 等の C 2 ～ C 2  
 0 の飽和または不飽和の脂肪族アシル基、ベンゾイル等の芳香族アシル基な  
 どが挙げられる。もっとも、これらは例示であり、例えば、脂肪族アシル基  
 のアルキル鎖は置換されていてもよく、一部または全部が環状でもよい。芳  
 香族アシル基の芳香環は炭素環でもヘテロ環でも縮合環でもよく任意に置換  
 されていてもよい。置換基の例としては、水酸基、アルキル基、アリール基、  
 アラルキル基、アミノ基、塩素、臭素等のハロゲン等が挙げられる。

### (1-3) アシル基受容体

25 また、本発明による高効率アシル基転移反応において使用するアシル基受  
 容体は、上記 C ○ A 酵素の基質としうる限り制限は無い。酵素の基質特異性



を反応条件によって変化させることや、タンパク質工学的に基質特異性を変化させた変異体などを用いることにより、酵素の通常的好適な基質でない物質をもアシル基受容体とし得る。

- 好ましいアシル基受容体は、アミノ酸、アミノ酸誘導体であり、天然アミノ酸、非天然アミノ酸が特に好ましい。例えば、アミノ酸がセリンで酵素がセリン C-パルミトイルトランスフェラーゼである場合、3-ケトジヒドロスフィンゴシンの効率的合成反応となる。また、アシル基受容体がアミノ酸誘導体であるスフィンゴシンで酵素がスフィンゴシン N-アシルトランスフェラーゼである場合、セラミドの効率的合成反応となる。なお、アシル基転移反応における生成物は、転移したアシル基をそのまま有するとは限らず、反応条件下で脱炭酸や転位等を経てもよく、一般的には用いる酵素と基質により定まる。

#### (1-4)反応条件

- 本発明による高効率アシル基転移反応において使用する C o A は、化学合成法、半合成法、生物発酵法などいずれの方法で製造されたものでもよく、C o A として機能し得るものであれば良い。

- 本発明による高効率アシル基転移反応において、使用する反応系は、アシル基供与体と C o A のエステル交換反応と、用いる C o A 酵素によるアシル C o A からアシル基受容体へのアシル基転移反応が同時に進行する系である限り制限は無く、水均一系、有機溶媒均一系、あるいは有機溶媒-水二層系等を用いることができる。

本発明の反応は、C o A 酵素の安定性が確保され、反応が進行する温度であればよい。通常 10℃～45℃であり、好ましくは、20℃～40℃である。

- 本発明の反応は、濃度に関しても C o A 酵素の安定性が確保され、反応が進行するならば、特に制限はない。

反応系は開放型でも密閉型でも良く、臭気等が問題になる場合には密閉系において反応を行えば良い。

## (2)高分子生成反応

### (2-1)高分子化合物

- 5 前述のように、本発明は、高分子生成反応としても有用であり、具体的にはチオエステル交換反応と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから高分子化合物を合成する高分子化合物の製造方法に関するものである。

- 本発明において合成される高分子化合物としては、チオエステル交換反応  
10 と高分子重合酵素反応を共存させた溶液中でチオエステルから合成される高分子化合物であれば制限はないが、例としては、これまで主に微生物の発酵生産により製造されることが報告されているポリヒドロキシアルカノエート(PHA)を挙げることが出来る。その種類は90種以上が知られている(FEMS Microbiol. Lett., 1995, 128, 219)。更に具体的には、側鎖にC2以上の  
15 アルキル鎖を持つもの、その中にはC6以上、更にはC10以上の長鎖アルキル基を有するもの、側鎖に分岐したアルキル基を持つもの、側鎖にフェニル環を持つもの、その中にはフェニル環に修飾基を有するもの、側鎖にフェノキシ環を有するもの、その中にはフェノキシ環に修飾基を有するもの、側鎖に二重結合あるいは三重結合を有するもの、その中には良好な重合性を示  
20 すもの、側鎖にハロゲン元素を有するもの、側鎖にシクロ環を有するもの、側鎖にエポキシ環を有するものなどがある。これらのPHAはホモポリマーであることもあれば、2種類以上のユニットからなるコポリマーも含まれる。

- 具体的には、アルキル基については Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, 92-101  
など、フェニル環については Macromol. Chem., 1990, 191, 1957-1965、  
25 Macromolecules, 1991, 24, 5256-5260、Macromolecules, 1996, 29, 1762-1766 など、  
フェノキシ環については Macromolecules, 1996, 29, 3432-3435、Macromol.

- Chem. Phys., 1994, 195, 1665-1672 など、二重結合については Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54, 2924-2932、Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12, 85-91、J. Polym. Sci., Part A, 1995, 33, 1367-1374、Macromolecules, 1994, 27, 1675-1679、Macromolecules, 1998, 31, 1480-1486 など、三重結合については Macromolecules, 1998, 31, 4760-4763 など、ハロゲン元素については Macromolecules, 1990, 23, 3705-3707、J. Chem. Soc. Polym. Commun., 1990, 31, 404-406、Macromolecules, 1992, 25, 1852-1857、Macromolecules, 1996, 29, 4572-4581 などエポキシ環については Macromolecules, 1999, 32, 7389-7395 などに示された P H A も含まれ、炭素数も多様である。
- 10 高分子化合物の具体例としては、主に生物、特に微生物の発酵生産により製造されることがよく知られているポリ（3-ヒドロキシアлкаノエート）やポリ（4-ヒドロキシアлкаノエート）を挙げることが出来る。更に、具体的には特にポリ（3-ヒドロキシブチレート）を挙げることができる。もっとも、これらは例示であり、本発明の方法によって高分子を形成し得る重
- 15 合単位を含む高分子化合物はすべて含まれる。また、複数の種類の重合単位の組み合わせを含んでもよい。重合度は酵素反応が進行する限りにおいて特に制限はない。

- 本発明に利用できるの高分子重合酵素反応は制限はないが、例としてはアシルコエンザイム A としてヒドロキシアлкаノエートコエンザイム A を用いる反応を挙げることが可能であり、その場合は高分子化合物として P H A が生成する。
- 20

#### (2-2) C o A 酵素

- 本発明で使用する高分子重合酵素としては、本発明のチオエステル交換反応で生成する物質を基質として高分子化合物を合成する高分子重合酵素であればよい。例えば、ヒドロキシアлкаノエート C o A を基質とし、P H A とする場合、酵素であるポリヒドロキシアлкаノエートシンターゼ（P H A S）
- 25

を用いることが出来る。高分子重合酵素の取得方法は生物細胞から抽出精製する方法、あるいは生物培養物から抽出精製する方法など多種多様の方法が使われるが、例としてはPHASは微生物細胞から抽出精製することが出来る。しかし通常の抽出精製方法では取得出来る酵素量が極めて少量に限られることから、近年は遺伝子組換え技術を利用してPHASの遺伝子を単離し  
5 (J. Biol. Chem., 1989, 264, 15298-15303、J. Bacteriol., 1988, 170, 4431-4436、J. Bacteriol., 1988, 170, 5837-5847)、高発現させることで高分子重合酵素を大量に分離精製できる(J. Biochemistry, 1994, 33, 9311-9320、Protein Expression Purif., 1996, 7, 203-211)。また本発明の高分子重合反応で使用される酵素は、そのま  
10 ま用いる場合のほかに、固定化酵素などの手法で修飾した酵素を用いることもできる。

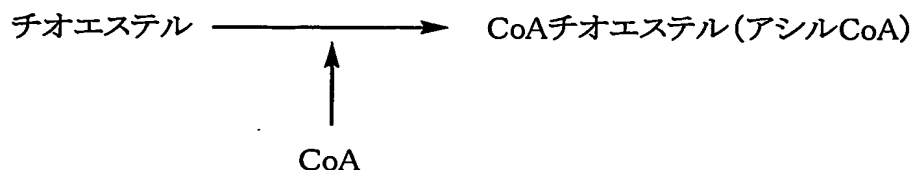
本発明で用いる高分子重合酵素の由来に生物種としては特に制限はないが、例としてはPHAの生産がよく知られているラルストニア (Ralstonia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、クロマチウム (Chromatium) 属、エクトチ  
15 オロドスピラ (Ectothiorhodospira) 属をはじめ多くの微生物を挙げることが出来る。またこれらの生物由来の高分子重合酵素遺伝子を供与体として有する遺伝子組換え体から高分子重合酵素を取得することも可能である。例としてはラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) ATCC17699のPHASの  
20 遺伝子を単離し、その組換え体エシェリキア コリ (Escherichia coli) を作製して培養し、その培養産物から所望のPHASを抽出精製して、高分子重合反応の触媒として用いることが可能である。

### (2-3)アシル基供与体

本発明による高分子生成反応において使用するアシル基供与体は、アシル基が高分子の構造単位となり得るものであるという点を除いて、前述の高効  
25 率アシル基転移反応と同様であり、芳香族チオールのアシルエステルが好ましい。芳香族チオールの例は、前記の通りである。

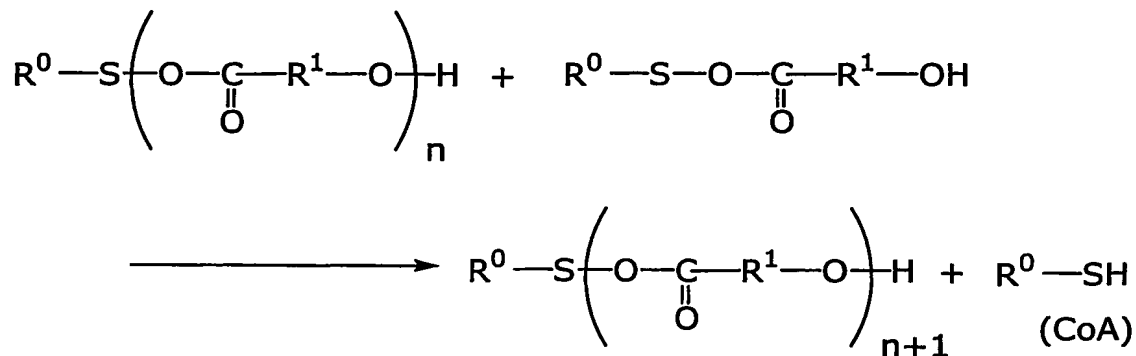
チオエステルの製法は例えば、J. Am. Chem. Soc., 1973, 22, 5829 に記載されている。

このチオエステルはアルカリ条件でC○A塩と共存させることで容易にC○AのチオエステルであるアシルC○Aへと変換するチオエステル交換反応が可能である (Int. Symp. Bacterial. Polyhydroxyalkanoates, 1996, 28-35)。



#### (2-4) アシル基受容体

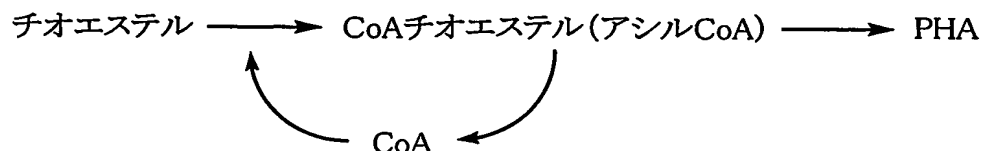
インビトロ重合方法では酵素の基質としてC○Aチオエステルを用い、酵素が反応してPHAが重合されると共に、反応系内には遊離したC○Aが放出される。C○Aチオエステルは反応当初に投入されるものと反応の進行により生じたものの両者が含まれるが、いずれにせよ、生成物は重合体とC○Aである（下記式）。



(式中、 $R^0$ は $R^0-SH$ がC o Aを表わす有機基であり、 $R^1$ は任意のアルキ  
15 レン、 $n$ は重合度に相当する整数である。)

本発明は、上記２つの反応、つまりチオエステル交換反応と高分子重合反応の２つの反応を組み合わせて、これらを１つの反応系内で共存させて実施

することにより高分子化合物を製造する。つまり、重合反応後には反応系内に遊離されてこれまでは再び利用されることのなかったC o Aを、反応系内に投入したチオエステルと反応させて、再びC o Aのチオエステルを合成せしめ、これを重合反応の基質として再び用いるものである（下記式）。



これにより反応系内に投入したC・Aの当量以上の高分子化合物を生成物として得ることができるようになる。特にこのC・Aがチオエステル化と遊離を繰り返すことの反応回転数が多くなればなるほど、高分子化合物の工業的なコストを飛躍的に低価格化させることが可能となる。

10      また、重合が進むにつれて反応系内のC o A濃度が高まることで酵素反応への阻害効果をもたらすことがあるが、本発明では、その濃度を抑えることでPHAの生産性を高めるのに非常に有効である。このように本発明は、高効率にPHAを製造する方法である。

本発明の反応条件としては特に制限がなく、高効率アシル基転移反応と同様であるが、例としては酵素反応が促進される条件として、温度としては0℃から60℃、好ましくは10℃から50℃、さらに好ましくは20℃から40℃で行うことが望ましい。簡便には室温下で反応を行うことも可能である。pHは3から12、好ましくは5から10、さらに好ましくは7から9の間で行うことが望ましい。

20      なお、チオエステル交換反応と高分子重合反応が共存する状態とは、チオエステル交換反応と高分子重合反応が同一の水溶液、有機溶媒、あるいはその混合溶液中に存在すること、あるいは同一反応容器内において一種の溶液、あるいは複数の溶液が混合状態あるいは分離状態で存在している状況である。分離状態は、層状の場合、油滴状に存在、あるいは目視的に懸濁した状態な

どが含まれる。いずれにおいても、チオエステル交換反応と高分子重合反応に必要な状態が一体化して確保されていればよい。そしてその出発物質としては工業的に効率的に製造可能なチオエステルを用いて、これを反応系内でC o Aのチオエステル化して重合反応の基質とし高分子化合物を製造する。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 10 実施例1：アシルチオフェノール（チオフェニルパルミテート）の合成

よく乾燥させて窒素置換したフラスコに無水ジクロロメタン6 mLを添加し、氷上で冷やしながらよく攪拌した。そこに2 Mトリメチルアルミニウム2 mLをゆっくりと添加した。さらにチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で1時間30分攪拌を続けた後、無水ジクロロメタン6 mLに溶解した

15 パルミチン酸エチルエステルをゆっくりと添加して反応させた。反応はTLCでモニターした。反応終了後、反応液にジクロロメタン20 mLを加え、更に気泡発生が無くなるまで3%塩酸水溶液を添加した。この溶液を分液漏斗に移して、3%塩酸水溶液で3回、飽和食塩水で2回洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過して硫酸マグネシウムを除去した後、エバポレーションで濃縮し、濃黄色のオイル状溶液を得た。これをシリカゲルカラムクロ

20 マトグラフィー（溶離液：ヘキサン／酢酸エチル＝2／1）によって分離精製してチオフェニルパルミテートを得た。

#### 実施例2：セリン C-パルミトイルトランスフェラーゼ（SPT）の調製

25 Sphingomonas 属由来の上記酵素を大腸菌にクローン化した形質転換体からSPT粗酵素抽出液を得た。本形質転換体の作成法、SPT精製法は Ikushiro,

H.らによる「The Journal of Biological Chemistry 276, 18249-18256 (2001)」の記載に従った。

まず、上記SPTの全塩基配列から、N末端配列とC末端配列をコードするプライマー（配列番号1及び配列番号2）を作成し、Sphingomonas  
 5 paucimobilis の染色体DNAを鋳型として、以下の条件でPCRによりSPTコード領域に相当するDNA断片を作成した。このとき、N末端用プライマーにはベクターへの接続のためNcoIサイトを、C末端用プライマーにはHindIIIサイトを設けた。

[プライマー]

- 10 N末端用プライマー 5' -accatgaccgaagccgccgtca-3' (配列番号1)  
 C末端用プライマー 5' -taagcttcagccgatgacgccg-3' (配列番号2)

[反応液組成]

- LA Taq ポリメラーゼ (Polymerase)、  
 同酵素添付の標準緩衝液、  
 15 鋳型染色体 < 1  $\mu$ g、  
 プライマー 各 1  $\mu$ M、  
 dNTP 各 200  $\mu$ M、  
 液量 25  $\mu$ L ~ 100  $\mu$ L。

[反応条件]

- 20 変成温度 94°C、30秒、  
 アニール温度 40 + 0.25°C/サイクル、30秒、  
 伸張温度 72°C、90秒。

- 作成したPCR断片をアガロースゲル電気泳動した後ゲルより抽出し、カラムにより回収した。この断片を制限酵素NcoI-HindIIIで処理し、プラ  
 25 スミドpET21dのNcoI-HindIII断片とライゲーションし、宿主大腸菌BL21 (DE3) 株を形質転換した。



作成した形質転換体をアンピシリン 50 ppm を含む LB 培地 5 mL で、35℃、16 時間培養した後、菌体を遠心分離して回収し、生理食塩水で洗浄した。洗浄菌体を SPT 用緩衝液（20 mM リン酸緩衝液（pH 6.5, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1 mM AEBSF（プロテアーゼ阻害剤）, 0.02 mM PLP を含む））2 mL に再懸濁し、氷冷しながら超音波破碎機で約 10 分間破碎した後、未破碎物を遠心分離（12,000 rpm × 10 分間）して除去し粗酵素抽出液を得た。

実施例 3：エステル交換反応と CoA 酵素反応のカップリング（水均一系）

10 CoA ナトリウム塩 2 mg と L-セリン 1 mg を 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液（10 μM PLP を含む、pH 8.0）5 mL に溶解し、マグネチックスターラーでよく攪拌した。そこにチオフェニルパルミテート 3.5 mg をアセトニトリル 0.1 mL で溶解させた溶液を混合した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として SPT 粗酵素液 0.5 mL を添加し、24 時間、37℃  
15 で反応させた。この溶液を 2 N アンモニア溶液 1 mL でアルカリ性とした後、クロロホルム／メタノール（2：1（v/v））5 mL で溶液中の生成物を抽出、回収した。抽出液をフィルターろ過した後適当に濃縮し、下記の分析法に従って 3-ケトジヒドロスフィンゴシンを定量したところ、生成量は約 1.0 mg であった。

20 [スフィンゴシン類の分析法]

Tanaka, M. らによる Journal of Chromatography 284, 433-440 (1984) に記載の方法に従い TLC-FID (Iatroscan) を用いてスフィンゴシン類の定量分析を行った。すなわち、標準試料として 1～10 mg のジヒドロスフィンゴシン（スフィンガニン）または 3-ケトジヒドロスフィンゴシンをメタノール 1 mL  
25 に溶解した溶液 1 μL を、クロマトロッド S II（シリカゲル）に供し、一次展開液（クロロホルム-メタノール-15 N アンモニア溶液 = 60：10：

1で展開した。展開後のロッドをIATROSCAN TH-10 TLC/FID Analyser (IATRON 社製) に供することでスフィンゴシン類を検出定量した。

さらに詳細なスフィンゴイド塩基類の定量分析は、文献 (Analytical Biochemistry, 298 (2001) 283-292) などを参考にし、生成物を蛍光誘導体化した

5 後高速液体クロマトグラフィーによって分離分析した。

後述の反応液 75  $\mu$ L を取り、70.6 mM トリエチルアミン/エタノール 溶液 425  $\mu$ L を添加し攪拌した。5 分間遠心して沈殿を除き、上清を HPLC サンプルバイアル (300  $\mu$ L 微量インサート) に 100  $\mu$ L を取り、AQC 試薬 (Waters 社製) 溶液 20  $\mu$ L を添加し、直ちに攪拌した。室温で

10 40 分以上反応した後、下記の HPLC 条件で分析した。

本体: LC-VP シリーズ (島津製作所) (ポンプ LC-10ADVP、カラムオープン CTO-10ACVP、オートサンプラー SIL-10AF、システムコントローラー SCL-10AVP)

検出器: 蛍光検出器 821-FP (日本分光) Ex.244nm, Em.398nm, Gain x100

15 カラム: SHODEX F-511A, 35  $^{\circ}$ C

溶離液: アセトニトリル/メタノール/水/トリメチルアミン = 480 / 320 / 190 / 7、1.5 ml/min。

カラム再生方法: 文献法の再生法はカラム圧が高くなりすぎエラーが出やすいため、下記の通り変更した。

20 再生液 アセトニトリル/メタノール = 60 / 40

↓

溶離液より再生液へ1分間のリニアグラディエントで切換え (1.5ml/min)

↓

12分間再生液を通液 (1.5ml/min)

25

↓

再生液より溶離液へ1分間のリニアグラディエントで切換え (1.5ml/min)

↓

2分間溶離液を通液（1.5ml/min）後、分析条件に戻す。

分析サイクル：試料分析毎にカラム再生系を入れる。再生時はサンプル注入しない。

5

比較例1：カップリング系を用いないC o A酵素反応

10 パルミトイルC o A 10 m g とL-セリン1 m g を100 m M HEPES-N a O H緩衝液（10  $\mu$  M P L Pを含む、p H 8.0）5 m Lに溶解し、マグネチックスターラーでよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落としてS P T粗酵素液0.5 m Lを添加し、24時間、37℃で反応させた。この溶液を2 Nアンモニア溶液1 m Lでアルカリ性とした後、クロロホルム／メタノール（2：1（v／v））5 m Lで溶液中の生成物を抽出、回収した。抽出液をフィルターろ過した後適当に濃縮し、実施例3と同様に分析した結果、3-ケトジヒドロスフィンゴシンの生成量は約0.02m gであった。

15

実施例4：エステル交換反応とC o A酵素反応のカップリング（油水二層系）

20 C o Aナトリウム塩2 m g とL-セリン1 m g を100 m M HEPES-N a O H緩衝液（10  $\mu$  M P L Pを含む、p H 8.0）5 m Lに溶解し、マグネチックスターラーでよく攪拌した。そこにチオフェニルパルミテート3.5 m g をヘキサン5 m Lで溶解させた溶液を混合した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落としてS P T粗酵素液0.5 m Lを添加し、24時間、37℃で反応させた。この溶液を2 Nアンモニア溶液1 m Lで酸性化した後、クロロホルム／メタノール（2：1（v／v））5 m Lで溶液中の生成物を抽出、回収した。抽出液をフィルターろ過した後適当に濃縮し、実施例3と同様にして  
25 3-ケトジヒドロスフィンゴシンを定量分析したところ、生成量は約2.2 m gであった。

以下、本発明による高分子化方法の例を挙げる。

参考例 1 (1) : 3-オキソブチレートエチルエステルの合成

氷上で、乾燥したフラスコ中で 3.9 g のメルドラム酸を 18 ml の脱水ジクロロメタンに溶かして攪拌したところへ、18 ml の脱水ジクロロメタンに溶解した 4.3 g のピリジンと 2.2 g のアセチルクロライドの溶液を窒素気流下でゆっくりと添加した。攪拌は 0℃ で 1 時間の後、室温で 2 時間行った。混合液を分液漏斗に移し、3% 塩酸溶液で 2 回、飽和食塩水で 2 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして、ゆっくりと固化する濃オレンジ色でオイル状の 3.6 g の粗アシル化メルドラム酸を得た。この粗アシル化メルドラム酸を 80 ml の脱水エタノール中で還流した。この時二酸化炭素の発生が観察された。溶媒をエバポレーションで取り除き、赤色オイル状の 1.3 g の粗 3-オキソブチレートエチルエステルを得た。これをシリカゲル 60 のカラムクロマトグラフィー (20 cm × Φ 1 cm、溶離液はヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、少し黄色でオイル状の 0.60 g の精製 3-オキソブチレートエチルエステルを得た。収率は未精製品に対して 46% であった。この化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

$^1\text{H}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.20(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 3.47(s, 2H), 2.27(s, 3H), 1.28(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H);

20  $^{13}\text{C}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.06, 167.44, 61.52, 50.29, 30.32, 14.29

参考例 1 (2) : 3-ヒドロキシブチレートエチルエステルの合成

乾燥したフラスコ中で 75.6 mg の水素化ホウ素ナトリウムを 2 ml の脱水エタノールに溶かした溶液を攪拌し、そこへ 520 mg の 3-オキソブチレートエチルエステルを 2 ml の脱水エタノールに溶解した溶液をゆっくりと添加した。攪拌は室温で 2 時間行い、その後 4 ml の水を添加した。混合溶

液を分液漏斗へ移し、ジクロロメタンで2回抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下でエバポレーションして、薄い黄色のオイル状の282 mgの3-ヒドロキシブチレートを得た。この化合物のNMR分析結果を以下に示す。

5  $^1\text{H}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.17(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 4.17(m, 1H), 2.46(m, 2H), 1.28(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H), 1.23(d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.93, 64.28, 60.68, 42.91, 22.49, 14.18

参考例1 (3) : 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルの合成

10 氷上で乾燥したフラスコ中で6 mlの脱水ジクロロメタンを攪拌し、そこへ2 mlの2Mトリメチルアルミニウムを窒素気流下でゆっくりと添加した。そこへ続けて2 mmolのチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で30分間攪拌し、続けて6 mlの脱水ジクロロメタンに溶解した3-ヒドロキシブチレートを添加した。反応はTLCでモニターした。この混合液に20 mlのジクロロメタンを加え、気泡発生が止むまで20 mlの3%塩酸溶液を添加した。混合液を分液漏斗へ移し、3%塩酸溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下でエバポレーションして濃黄色のオイル状の532 mgの粗3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー (20 cm $\times$   $\Phi$  1 cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル=2 : 1) で精製し、透明なオイル状の125 mgの3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。収率は未精製品に対して24%であった。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

$^1\text{H}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.38(s, 5H), 4.33(m, 1H), 2.83(m, 2H), 1.25(d, 3H);

25  $^{13}\text{C}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.24, 134.90, 130.07, 129.69, 127.61, 65.23, 52.02, 22.85

## 参考例 1 (4) : 3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステルの合成

小さなガラス瓶に 39.5mg のコエンザイム A ナトリウム塩を 0.5ml の 100mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH 8.0) に攪拌して溶かした溶液に、9.8mg の 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを 0.1ml のアセトニトリルに溶かした溶液を添加した。攪拌は室温で 3 時間続け、次に 0.13ml の 1M リン酸を添加した。混合液を 0.5ml のジエチルエーテルで 3 回洗浄し、減圧下でエバポレーションして 30mM の 3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステル溶液を得た。

10

## 参考例 2 (1) : (R) - 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルの合成

2.53g の t-ブチルジメチルシリルクロライドを無水ジメチルホルムアミドに溶かして攪拌したところへ、3.4g のイミダゾールを添加し、氷上、窒素

15 気流下で 15 分攪拌した。更に無水ジメチルホルムアミドに溶解した 0.5g の (R) - 3-ヒドロキシブチレートを添加して室温で一晩攪拌した。反応液に 60ml の飽和食塩水を加え、ジエチルエーテル : 石油エーテル = 1 : 3 溶液での抽出を 5 回繰り返した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションした。これをメタノール : テトラヒドロフラン = 2 :

20 1 溶液に溶解し、1.5g の炭酸カリウムを含む 10ml の水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。反応液は飽和食塩水で希釈し、更に 1M 硫酸で pH を 3.0 に調整し、ジエチルエーテル : 石油エーテル = 1 : 3 溶液での抽出を 5 回繰り返した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーション後、真空乾燥して 3- (t-ブチルジメチルシリル) ブチレートを得た。氷上で、

25 870mg の 3- (t-ブチルジメチルシリル) ブチレートと 452mg のチオフェノールを 6ml のジクロロメタンに溶解し、これに 2ml のジクロ

ロメタンに溶解した 846 mg のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加し  
攪拌後、室温で 10 時間攪拌した。20 ml のジエチルエーテルを加えてろ  
過後、溶媒をエバポレーションで取り除き、フラッシュクロマトグラフィー  
(溶離液は 5 % 酢酸エチルを含むヘキサン) で 330 mg の 3- (t-ブチ  
5 ルジメチルシリル) ブチレートチオフェニルエステルを得た。これを 2 ml  
アセトニトリルに溶解し、更に 6 ml の 5 % フッ化水素を含むアセトニトリ  
ル溶液を加えた。20 分の反応後、気泡が発生しなくなるまで飽和炭酸水素  
ナトリウム溶液を添加し、ジエチルエーテルで抽出後、飽和食塩水で洗浄、  
硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして 81 mg の (R)  
10 -3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを得た。

参考例 2 (2) : (R) -3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステルの  
合成

3-ヒドロキシブチレート CoA チオエステルの合成と同様にして、3-  
15 ヒドロキシブチレート CoA チオエステル溶液を得た。

参考例 3 (1) : 3-オキソバレレートエチルエステルの合成

氷上で、乾燥したフラスコ中で 3.9 g のメルドラム酸を 18 ml の脱水ジク  
ロロメタンに溶かして攪拌したところへ、18 ml の脱水ジクロロメタンに  
20 溶解した 4.3 g のピリジンと 2.5 g のプロピオニルクロライドの溶液を窒素気  
流下でゆっくりと添加した。攪拌は 0℃ で 1 時間の後、室温で 2 時間行った。  
混合液を分液漏斗に移し、3 % 塩酸溶液で 2 回、飽和食塩水で 2 回洗浄し、  
硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下でエバポレーションして、ゆっくりと固  
化する濃オレンジ色でオイル状の 3.4 g の粗アシル化メルドラム酸を得た。こ  
25 の粗アシル化メルドラム酸を 80 ml の脱水エタノール中で還流した。この  
時二酸化炭素の発生が観察された。溶媒をエバポレーションで取り除き、赤

色オイル状の 1.7 g の粗 3-オキシバレレートエチルエステルを得た。これをシリカゲル 60 のカラムクロマトグラフィー (20 cm × Φ 1 cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、少し黄色でオイル状の 0.50 g の精製 3-オキシバレレートエチルエステルを得た。収率は未精製品に対して 29% であった。この化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

$^1\text{H}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.19(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 3.40(s, 2H), 2.58(q,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 1.28(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H), 1.08(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203.48, 180.07, 61.33, 49.03, 36.32, 14.13, 7.56

#### 10 参考例 3 (2) : 3-ヒドロキシバレレートエチルエステルの合成

乾燥したフラスコ中で 75.6 mg の水素化ホウ素ナトリウムを 1 ml の脱水エタノールに溶かした溶液を攪拌し、そこへ 288 mg の 3-オキシバレレートエチルエステルを 1 ml の脱水エタノールに溶解した溶液をゆっくりと添加した。攪拌は室温で 2 時間行い、その後 2 ml の水を添加した。混合溶液を分液漏斗へ移し、ジクロロメタンで 2 回抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下でエバポレーションして、薄い黄色のオイル状の 212 mg の 3-ヒドロキシバレレートを得た。この化合物の NMR 分析結果を以下に示す。

$^1\text{H}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.17(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 3.94(m, 1H), 2.45(m, 2H), 1.57(m, 2H), 1.27(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H), 0.96(t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.30, 69.64, 60.91, 41.46, 29.77, 14.40, 10.07

#### 参考例 3 (3) : 3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルの合成

氷上で乾燥したフラスコ中で 3 ml の脱水ジクロロメタンを攪拌し、そこへ 1 ml の 2M トリメチルアルミニウムを窒素気流下でゆっくりと添加した。そこへ続けて 1 mmol のチオフェノールをゆっくりと添加した。室温で 3



0分間攪拌し、続けて3mlの脱水ジクロロメタンに溶解した3-ヒドロキシバレレートを追加した。反応はTLCでモニターした。この混合液に10mlのジクロロメタンを加え、気泡発生が止むまで10mlの3%塩酸溶液を追加した。混合液を分液漏斗へ移し、3%塩酸溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下でエバポレーションして濃黄色のオイル状の258mgの粗3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを得た。これをシリカゲル60のカラムクロマトグラフィー（20cm×Φ1cm、溶離液はヘキサン：酢酸エチル＝2：1）で精製し、透明なオイル状の44mgの3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを得た。収率は未精製品に対して17%であった。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

$^1\text{H NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.39(s, 5H), 4.04(m, 1H), 2.82(m, 2H), 1.60(m, 2H), 0.98(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H);

$^{13}\text{C NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.30, 134.67, 129.83, 129.46, 127.31, 70.04, 50.03, 29.67, 9.96

#### 参考例3（4）：3-ヒドロキシバレレートCoAチオエステルの合成

小さなガラス瓶に79mgのコエンザイムAナトリウム塩を2mlの100mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）に攪拌して溶かした溶液に、42mgの3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステルを1mlのアセトニトリルに溶かした溶液を追加した。攪拌は室温で3時間続け、次に0.53mlの1Mリン酸を追加した。混合液を2mlのジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧下でエバポレーションして33mMの3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液を得た。

25

#### 参考例4：酵素の作製と精製

ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) ATCC17699 のゲノムDNAから制限酵素EcoRIとSmaI断片(約5kbp)を切り出し、pUC18にクローニングしてPHA合成酵素遺伝子(PHAS)を含むプラスミドpTI305を取得した。次にpTI305のNotI・StuI断片(1.6kbp)と、pTI305をテンプレートとして下記2種のプライマーでPCRにより増幅したDNAのBamHI・NotI断片(140bp)と、ベクターpQE30(キアゲン社製)のBamHIとSmaI断片の3種類を混合してライゲーションし、プラスミドpQERECを調整した。これを大腸菌BL21(pREP4)に導入して、酵素調製用の大腸菌BL21(pQEREC)を作製した。この大腸菌を1000mlのLB培地中、30℃で16時間培養し、菌体内に酵素を蓄積させ、超音波処理によって菌体を破壊した後、菌体内の可溶性タンパク質を回収した。このタンパク質をNi-NTAアガロースゲルカラムに通し、(His)-PhaC(N末端にヒスチジンが6個付加されている)を特異的にカラムに吸着させた。洗浄後、イミダゾールを用いて(His)-PhaCを溶出し、透析後に精製酵素として10mgを得た。酵素の分子量はSDS-PAGEで65kDaであった。

PCRの条件

センスプライマー：aaggatccatggcgaccggcaaggcgcg (配列番号3)、  
アンチセンスプライマー：tgcagcggaccggtggcctcggcctgccc (配列番号4)、  
20 サイクル：(94℃45秒、58℃30秒、72℃60秒)×30サイクル。

#### 実施例5：ポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに5mlの1mMCoAナトリウム溶液と、0.5mlの20mM3

- ーヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液（100 mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1：1溶液に溶解）を少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20 mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10 mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300 mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.4 mgのポリ（（R）-3-ヒドロキシブチレート）を得た。分子量（ポリスチレン換算のGPC）は $M_w=970000$ であった。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。
- 10  $^1\text{H NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.26(m, H), 2.53(m, 2H), 1.25(s, 3H);  
 $^{13}\text{C NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.53, 67.99, 41.16, 20.15

比較例2：ポリ（（R）-3-ヒドロキシブチレート）の重合

- 5 mlの100 mMリン酸カリウム溶液に0.015 mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに5 mlの1 mM CoAナトリウム溶液を少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20 mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10 mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300 mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。しかし沈殿物は得られなかった。
- 20

実施例6：（（R）-3-ヒドロキシブチレート）の重合

- 5 mlの100 mMリン酸カリウム溶液に0.015 mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに5 mlの1 mM 3-ヒドロキシブチレート CoA溶液と、0.5 mlの20 mM 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液（100
- 25

mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1 : 1溶液に溶解)を少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300  
5 mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.3mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。

比較例3 : ポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

10 5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、5mlの1mM3-ヒドロキシブチレートCoAを少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収し  
15 た。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.2mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。

20 比較例4 :

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として溶液温度を30℃に保ち、ここに0.5mlの20mM3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル溶液(100mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1 : 1溶液に  
25 溶解)を少しずつ添加し、さらに30℃で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液

中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。しかし沈殿物は得られなかった。

5 実施例7：ポリ（3-ヒドロキシバレレート）の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、ここに5mlの1mM（R，S）-3-ヒドロキシバレレートCoAと、0.5mlの20mM3-ヒドロキシバレレートチオフェニルエステル溶液（100mMリン酸カリウム溶液とアセトニトリルの1：1溶液に溶解）を少しずつ添加し、さらに室温で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.3mgのポリ（（R）-3-ヒドロキシバレレート）を得た。その化合物のNMR分析結果を以下に示す。

$^1\text{H NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.12(m, H), 2.56(m, 2H), 1.53(m, 2H), 0.81(t, 3H);

$^{13}\text{C NMR}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.71, 72.26, 39.17, 27.23, 9.76

20 比較例5：ポリ（3-ヒドロキシバレレート）の重合

5mlの100mMリン酸カリウム溶液に0.015mgの酵素を添加して室温でよく攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として5mlの1mM（R，S）-3-ヒドロキシバレレートCoAを少しずつ添加し、さらに室温で24時間反応させた。次にこの溶液を20mlのヘキサンで3回洗浄し、更に10mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出、回収した。これを3回繰り返した。抽出液はフィルターろ過した後、300mlのメタノール中に滴

下して24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.1mgのポリ((R)-3-ヒドロキシバレート)を得た。

5 実施例8 : (R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

- 5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)、1mM CoAナトリウム塩溶液に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち攪拌した。その上に10mM (R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステル
- 10 を5mlのヘキサン溶液を重層した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、
- 15 真空乾燥機で乾燥し、1.5mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。分子量(ポリスチレン換算のGPC)は $M_w=1070000$ であった。また、添加したCoAのチオエステル化と遊離の反応回転数は3.4回である。

比較例6 : (R)-3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

20

- 5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)、1mM (R)-3-ヒドロキシブチレートCoAチオエステル溶液に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち攪拌した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下し
- 25

て4℃で24時間放置した。生成した沈殿物をフィルターろ過して回収し、真空乾燥機で乾燥し、0.4mgのポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)を得た。

5 比較例7：(R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルからポリ((R)-3-ヒドロキシブチレート)の重合

5mlの100mMリン酸ナトリウム溶液(pH7.5)に0.015mgの酵素を添加して溶液温度を30℃に保ち攪拌した。その上に10mM(R)-3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルを5mlのヘキサン溶液を重層  
10 した。攪拌速度を軽く混ざる程度に落として、30℃で24時間反応させた。反応後にヘキサン層を除去し、次に水層中から5mlのクロロホルムで溶液中の生成物を抽出した。これを2回繰り返した。抽出溶液をフィルターろ過した後、200mlのメタノール中に滴下して4℃で24時間放置した。沈殿物は観察されなかった。

15

産業上の利用可能性

アシル基転移酵素を用いる本発明の方法によれば、極めて高価なアシルコ  
エンザイムA(アシルCoA)を追加添加することなく反応を継続的に行い、  
その生産性を飛躍的に改善することができる。従って、アシル基転移酵素の  
20 工業的製法への利用を可能とした新規なカップリング法により、種々の化合物を製造することができる。本発明によれば、スフィンゴイド塩基類の製造方法において、酵素反応にチオエステル交換反応を組み合わせ、従来の発酵法による方法では困難であったスフィンゴイド塩基類を細胞毒性の問題無く蓄積生産せしめ、さらに反応に必須である補酵素アシルCoAについても  
25 その再生反応を同一反応液系内で行うことが可能となり、補酵素の消費量が劇的に減少し、経済的にスフィンゴイド塩基類を製造することができる。こ

の発明により、様々なスフィンゴイド塩基類を安価かつ純粋に製造できるようになり、その用途が飛躍的に広がる。

- また、PHAの製造方法において、インビトロ (in vitro) 重合方法にチオエステル交換反応を組み合わせることで、反応出発物質を容易に合成可能なチオフェニルエステルに代替し、さらに重合反応で必須である補酵素アシルC o Aについてもその再生反応を同一反応液系内で行うことが可能となり、補酵素の消費量を劇的に減少でき、様々なPHAを安価に効率よく工業的に製造でき、その用途が飛躍的に広がる。
- 5



## 請 求 の 範 囲

1. アシルコエンザイムA（アシルC o A）のアシル基を転移するアシル  
基転移酵素反応において、チオール化合物のアシルエステルであるアシル基  
5 供与体との化学的チオエステル交換反応によって、コエンザイムAよりアシ  
ルコエンザイムAを反応系内で生成および／または再生させて反応させるこ  
とを特徴とするアシル基転移酵素反応方法。
2. 反応系内にアシル基供与体、アシル基受容体、コエンザイムA、及び  
10 アシル基転移酵素を同時に含み、アシル基供与体のアシル基を化学的チオエ  
ステル交換反応によってコエンザイムAに転移させてアシルコエンザイムA  
とし、アシルコエンザイムAのアシル基をアシル基受容体に転移させる請求  
項1に記載のアシル基転移酵素反応方法。
- 15 3. アシル基供与体のアシル基でアシルコエンザイムAを生成および／ま  
たは再生しながら行う請求項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。
4. チオール化合物が芳香族チオールである請求項2に記載のアシル基転  
移酵素反応方法。  
20
5. 芳香族チオールが置換基を有していてもよいチオフェノールである請  
求項4に記載のアシル基転移酵素反応方法。
6. アシル基受容体がアミノ酸および／またはその誘導体である請求項2  
25 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

7. アシル基受容体がセリンおよび／またはその誘導体である請求項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。

5 8. アシル基転移酵素がセリン C-パルミトイルトランスフェラーゼである請求項1または2に記載のアシル基転移酵素反応方法。

9. セリン C-パルミトイルトランスフェラーゼがスフィンゴモナス (Sphingomonas) 属細菌由来のものである請求項8に記載のアシル基転移酵素反応方法。

10

10. アシル基転移酵素がスフィンゴシン N-アシルトランスフェラーゼである請求項1または2に記載のアシル基転移酵素反応方法。

11. 反応系内にアシル基供与体、アシル基受容体、コエンザイムA、及びアシル基転移酵素を同時に含み、アシル基供与体のアシル基を化学的チオエステル交換反応によってコエンザイムAに転移させてアシルコエンザイムAとし、アシルコエンザイムAのアシル基をアシル基受容体に転移させる反応において、アシル基転移酵素が高分子重合酵素であり、高分子化合物を合成する請求項2に記載のアシル基転移酵素反応方法。

20

12. アシルコエンザイムAまたはアシル基転移酵素反応による生成物をアシル基受容体としてアシル基転移酵素反応を繰り返すことにより高分子化合物を生成する請求項11に記載のアシル基転移酵素反応方法。

25 13. アシルチオエステルが芳香族チオールのアシルエステルである請求項11に記載のアシル基転移酵素反応方法。

1 4. 芳香族チオールのアシルエステルがヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである請求項 1 3 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

5 1 5. ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルである請求項 1 4 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

10 1 6. 3-ヒドロキシアルカノエートチオフェニルエステルが 3-ヒドロキシブチレートチオフェニルエステルである請求項 1 5 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

1 7. 高分子重合酵素がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼである請求項 1 1 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

15

1 8. ポリヒドロキシアルカノエートシンターゼがラルストニア (Ralstonia) 属由来である請求項 1 7 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

20 1 9. ラルストニア (Ralstonia) 属がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) である請求項 1 8 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

2 0. ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) がラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) ATCC17699 である請求項 1 9 に記載のアシル基転移酵素反応方法。

25

2 1. 請求項 7 乃至 9 のいずれかに記載のアシル基転移酵素反応を用いる

スフィンゴイド塩基類の製造方法。

22. スフィンゴイド塩基類が3-ケトジヒドロスフィンゴシンである請求項21に記載の製造方法。

5

23. 請求項10に記載のアシル基転移酵素反応を用いるセラミド類の製造方法。

24. 請求項11乃至20のいずれかに記載のアシル基転移酵素反応を用いる高分子化合物の製造方法であって、高分子化合物がポリエステル類であるポリエステル類の製造方法。

10

25. ポリエステル類がポリヒドロキシアルカノエートである請求項24に記載のポリエステル類の製造方法。

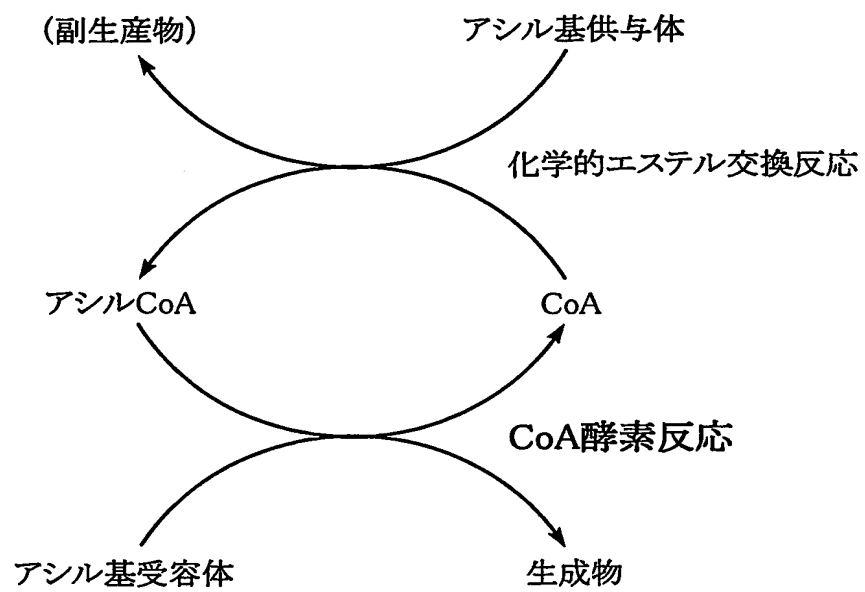
15

26. ポリヒドロキシアルカノエートがポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)である請求項25に記載のポリエステル類の製造方法。

27. ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)がポリ(3-ヒドロキシブチレート)である請求項26に記載のポリエステル類の製造方法。

20

図 1



## SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Acyltransferase reaction method using acylcoenzyme A

<130> SDF-4868PCT

<150> JP 2003-13762

<151> 2003-01-22

<150> JP 2003-94881

<151> 2003-03-31

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> *Sphingomonas paucimobilis*

<400> 1

accatgaccg aagccgccgc tca

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> *Sphingomonas paucimobilis*

<400> 2

taagctttca gccgatgacg ccg

23

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense primer

<400> 3

aaggatccat ggcgaccggc aaaggcgcg

30

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer

<400> 4

tgcagcggac cggtaggcctc ggcctgccc

29



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000500

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/62, C12N15/54, C12N9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/62, C12N15/54, C12N9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> <u>A</u>	Ouyang, T. et al., "A new chemical method for synthesizing and recycling acyl coenzyme A thioesters", Journal of Organic Chemistry, (1991), Vol.56, No.11, pages 3752 to 3755; full text	<u>1-3</u> <u>6-12, 17-27</u> <u>4, 5, 13-16</u>
Y	Nagiec M.M. et al., "The LCB2 gene of Saccharomyces and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoylttransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis", Proc. Natl.Acad.Sci., USA, Vol.91, (1994), pages 7899 to 7902, abstract	1-3, 6-9, 21-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 April, 2004 (16.04.04)

Date of mailing of the international search report  
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000500

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Antonio, R.V. et al., "Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from <i>Ralstonia eutropha</i> : formation of novel copolyesters in recombinant <i>Escherichia coli</i> ", <i>FEMS Microbiology Letters</i> , (2000), Vol.182, No.1, pages 111 to 117; abstract	1-3,11,12, 17-20,24-27
Y	Yuan, W. et al., "Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from <i>Ralstonia eutropha</i> and <i>Allochromatium vinosum</i> ; characterization and substrate specificity studies", <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i> , (2001), Vol.394, No.1, pages 87 to 98	1-3,11,12, 17-20,24-27
Y	WO 02/008428 A2 (METABOLIX, INC.), 31 January, 2002 (31.01.02), Claims & US 2002/164729 A1                      & EP 1305439 A2	1-3,11,12, 17-20,24-27
Y	Narimatsu, S. et al., "Solubilization and partial characterization of fatty acyl-CoA: sphingosine acyltransferase (ceramide synthetase) from rat liver and brain", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , (1986), Vol.877, No.3, pages 334 to 341; abstract	1-3,10,23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000500

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P7/62, C12N15/54, C12N9/10

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P7/62, C12N15/54, C12N9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Ouyang, T. et al., "A new chemical method for synthesizing and recycling acyl coenzyme A thioesters" Journal of Organic Chemistry, (1991), Vol. 56, No. 11, pp. 3752-3755, 全文参照	1-3 6-12, 17-27 4, 5, 13-16
Y	Nagiec, M.M. et al., "The LCB2 gene of Saccharomyces and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91 (1994), pp. 7899-7902, 要約参照	1-3, 6-9, 21-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Antonio, R.V. et al., "Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from <i>Ralstonia eutropha</i> : formation of novel copolyesters in recombinant <i>Escherichia coli</i> " FEMS Microbiology Letters, (2000), Vol.182, No.1, pp.111-117, 要約参照	1-3, 11, 12, 17-20, 24-27
Y	Yuan, W. et al., "Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from <i>Ralstonia eutropha</i> and <i>Allochromatium vinosum</i> : characterization and substrate specificity studies" Archives of Biochemistry and Biophysics, (2001), Vol.394, No.1, pp.87-98	1-3, 11, 12, 17-20, 24-27
Y	WO 02/008428 A2 (METABOLIX, INC.), 2002.01.31, 請求の範囲参照 & US 2002/164729 A1 & EP 1305439 A2	1-3, 11, 12, 17-20, 24-27
Y	Narimatsu, S. et al., "Solubilization and partial characterization of fatty acyl-CoA: sphingosine acyltransferase (ceramide synthetase) from rat liver and brain" Biochimica et Biophysica Acta, (1986), Vol.877, No.3, pp.334-341, 要約参照	1-3, 10, 23

## 第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：